

277. Sur la cyclisation des polypeptides

par R. A. Boissonnas et Ingeborg Schumann.

(25 IX 52)

Puisque l'on peut attribuer une structure cyclique à la gramicidine S¹) et à la tyrocidine A²), et que d'autres polypeptides naturels tels que les gramicidines³) et les tyrocidines⁴) ont probablement également une structure cyclique, il était intéressant de chercher une méthode permettant de synthétiser des polypeptides cycliques. Le problème revient à former une liaison peptidique entre les deux extrémités d'une même molécule polypeptidique linéaire, c'est-à-dire à créer une liaison peptidique entre un groupe carboxyle et un groupe amino présents *simultanément* dans la même solution. Généralement, pour former une liaison peptidique, entre 2 molécules d'acides aminés ou de peptides, on forme d'abord un dérivé riche en énergie de l'une des molécules, que l'on met *ensuite seulement* en présence de l'autre molécule. Les dérivés riches en énergie les plus employés sont les chlorures d'acides, les azides, et les anhydrides mixtes⁵). L'extrémité de la molécule qui ne doit pas prendre part à la réaction est alors bloquée par un groupe sélectivement scindable.

Pour condenser entre elles les deux extrémités de la même chaîne polypeptidique, il faudra former le dérivé riche en énergie d'une des extrémités. Il sera donc nécessaire de protéger momentanément l'autre extrémité de la chaîne, puis il faudra libérer celle-ci au moment de la cyclisation dans des conditions suffisamment douces pour ne pas décomposer le groupement riche en énergie, qui est assez souvent instable.

Pour simplifier le problème, nous avons d'abord étudié la condensation du groupe carboxyle d'une molécule avec le groupe amino d'une *autre* molécule, ces deux molécules se trouvant mélangées dès le début en quantités équimoléculaires. Nous avons donc essayé

¹) F. Sanger, Biochem. J. **40**, 261 (1946); K. O. Pedersen & R. L. M. Synge, Acta Chem. Scand. **2**, 408 (1948); A. R. Battersby & L. C. Craig, Am. Soc. **73**, 1887 (1951); R. Conden, A. H. Gordon, A. J. P. Martin & R. L. M. Synge, Biochem. J. **40**, XLIII (1946).

²) A. R. Battersby & L. C. Craig, Am. Soc. **74**, 4019, 4023 (1952).

³) R. D. Hotchkiss, J. Biol. Chem. **141**, 171 (1941); R. L. M. Synge, Biochem. J. **39**, 355 (1945); **44**, 542 (1949); R. L. M. Synge, Biochem. J. **39**, 261 (1946).

⁴) R. D. Hotchkiss, J. Biol. Chem. **141**, 171 (1941); H. N. Christensen, J. Biol. Chem. **158**, 279 (1945).

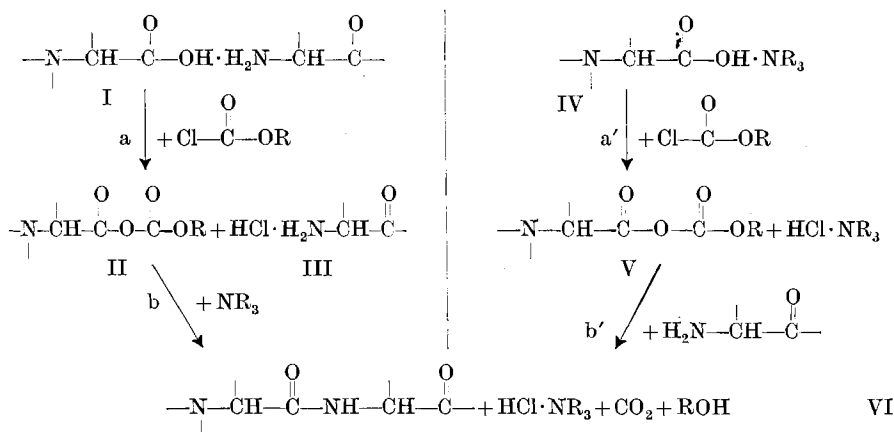
⁵) R. A. Boissonnas, Helv. **34**, 874 (1951); Th. Wieland & H. Bernhard, A. **572**, 190 (1951); J. R. Vaughan, Am. Soc. **73**, 3547 (1951); J. R. Vaughan & R. L. Osato, Am. Soc. **74**, 676 (1952); G. W. Anderson, A. D. Welcher & R. W. Young, Am. Soc. **73**, 501 (1951); J. R. Vaughan, Am. Soc. **73**, 1389 (1951).

de former une liaison peptidique entre une molécule de phtalyl-glycine et une molécule de glycinate d'éthyle dissoutes dans la même solution. Les conditions sont donc les mêmes que lorsqu'il s'agit de cycliser un peptide, à la différence près qu'il ne peut y avoir qu'un seul type de produit de condensation puisqu'il n'y a pas compétition entre la formation de cycle et celle de chaînes.

Le groupe carboxyle de la phtalyl-glycine salifie le groupe amino du glycinate d'éthyle donnant ainsi le phtalyl-glycinate de glycinate d'éthyle (I), assez facilement soluble dans les solvants organiques.

Lorsqu'on ajoute à cette solution un chloroformiate d'alcoyle, il se forme l'anhydride mixte de la phtalyl-glycine (II) et le chlorhydrate du glycinate d'éthyle (III). Par addition d'un équivalent de base tertiaire, le groupe amino du glycinate d'éthyle est désalifié, et peut donc réagir avec l'anhydride mixte II, avec formation de phtalyl-glycyl-glycinate d'éthyle (VI) et libération d'une molécule de carbonate d'alcoyle qui se décompose en anhydride carbonique et en alcool.

Il s'agit donc d'une réaction analogue à la réaction décrite indépendamment par *Boissonnas*¹⁾, *Wieland*²⁾ et *Vaughan*³⁾, dans laquelle le sel IV formé par addition d'une base tertiaire à un acide aminé ou à un peptide N-acylé est additionné d'un équivalent de chloroformiate d'alcoyle, et où l'anhydride mixte V ainsi formé, mis en présence d'un acide aminé, d'un peptide, ou d'un ester de ceux-ci, donne naissance à un peptide VI.



Le chloroformiate d'alcoyle ne réagit pas avec le groupe amino du glycinate d'éthyle, car celui-ci est salifié par le groupe carboxyle

¹⁾ *R. A. Boissonnas*, *Helv.* **34**, 874 (1951).

²⁾ *Th. Wieland & H. Bernhard*, *A.* **572**, 190 (1951).

³⁾ *J. R. Vaughan*, *Am. Soc.* **73**, 3547 (1951); *J. R. Vaughan & R. L. Osato*, *Am. Soc.* **74**, 676 (1952).

de la phtalyl-glycine au début de la réaction, et par l'acide chlorhydrique au fur et à mesure de la formation de l'anhydride mixte.

Le rendement de la réaction selon a—b est de 58 % alors qu'il est de 69,5 % selon a'—b¹⁾. La condensation d'un groupe carboxylique avec un groupe amino déjà présent dans la même solution (réaction a—b) peut donc se faire avec un rendement satisfaisant²⁾.

Après ces essais préliminaires, nous avons procédé à des essais de cyclisation de peptides neutres ayant leurs extrémités carboxylique et amino libres. Il est évident qu'il y aura compétition entre la formation de cycle et celle de chaînes, selon que les extrémités II et III qui se condensent en VI appartiennent à la même molécule, ou à deux molécules différentes. Selon la théorie, confirmée par les expériences de Ziegler³⁾, la formation de cycle au dépend de celle de chaînes, sera favorisée par la dilution.

Afin d'avoir une idée plus précise de la probabilité relative de la formation de cycle et de celle de chaînes, nous avons fait le calcul suivant qui suppose que les molécules ne sont pas associées, et qu'elles peuvent prendre librement toutes les positions possibles.

Selon Covey & Donohue⁴⁾ la longueur d'un reste d'acide aminé dans un peptide est de 3,635 Å.

Dans une chaîne polypeptidique étendue formée de n restes d'acides aminés, le groupe carboxylique terminal se trouve donc à $n \times 3,635$ Å du groupe amino terminal de l'autre extrémité. Si nous prenons comme point fixe le groupe carboxylique, et que nous considérons que le groupe amino peut occuper n'importe quelle position autour du groupe carboxylique, la chaîne peptidique pouvant se plier, le volume V dans lequel pourra se mouvoir le groupe amino sera de:

$$V = (2 \times n \times 3,635)^3 \frac{\pi}{6} \text{ \AA}^3 = 200 n^3 \text{ \AA}^3.$$

La molarité du groupe amino par rapport au groupe carboxylique de la même chaîne M a/c sera donc de

$$M \text{ a/c} = \frac{1700}{200 n^3} = \frac{8,5}{n^3} \text{ moles/litres,}$$

puisque dans une solution molaire on trouve en moyenne une molécule par 1700 Å³.

Le tableau I indique les valeurs de M a/c pour différents polypep-

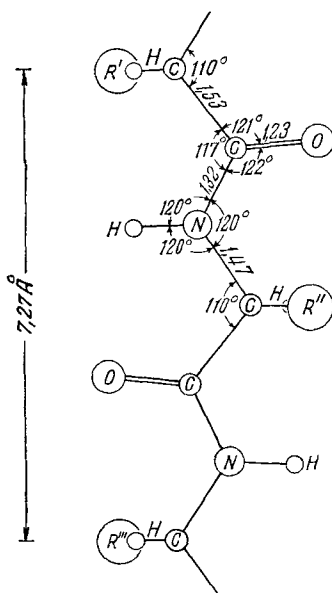


Fig. 1.

¹⁾ R. A. Boissonnas, Helv. **34**, 874 (1951).

²⁾ Note. Si au mélange de phtalyl-glycine et de glycinate d'éthyle on ajoute d'abord la base tertiaire et ensuite seulement le chloroformiate d'alcoyle, le rendement n'est que de 27,4% car une partie du chloroformiate réagit avec le groupe amino non salifié du glycinate d'éthyle.

³⁾ K. Ziegler, H. Eberle & H. Ohlinger, A. **504**, 95 (1933).

⁴⁾ Am. Soc. **72**, 2899 (1950).

tides, c'est-à-dire les molarités auxquelles la probabilité de formation d'un cycle est la même que celle de la formation d'une chaîne au début de la réaction de cyclisation. Il faudra donc travailler avec des molarités 10 ou 100 fois plus faibles pour que la probabilité de formation d'un cycle au début de la réaction soit respectivement 10 ou 100 fois plus grande que la probabilité de formation d'une chaîne. Il est évident qu'au fur et à mesure que la réaction se déroule la probabilité de formation d'un cycle va augmenter, puisque le groupe amino se trouvera toujours à la même distance moyenne du groupe carboxylique de la même chaîne, tandis qu'il se trouvera à des distances moyennes de plus en plus grandes des groupes carboxyliques d'autres molécules, le nombre absolu de groupes carboxyliques diminuant continuellement pendant la réaction.

Tableau I.

		M a/c
		Molarité d'un groupe amino d'une chaîne polypeptidique par rapport au groupe carboxylique de la même chaîne
dipeptide	n = 2	1,06 moles/litre
tripeptide	3	0,3
tétrapeptide	4	0,13
pentapeptide	5	0,068
hexapeptide	6	0,04
heptapeptide	7	0,025
octapeptide	8	0,017
decapeptide	10	0,0085
cicosipeptide	20	0,0011
hecatopeptide	100	0,0000085

Nous avons d'abord essayé de cycliser la tri-glycyl-glycine et la penta-glycyl-glycine. Comme ces deux peptides se sont montrés insolubles dans tous les solvants organiques que nous avons essayés, nous nous sommes efforcés de faire réagir le chloroformiate d'éthyle sur des suspensions de ces deux peptides dans de la diméthylformamide, en espérant obtenir des chlorhydrates solubles des anhydrides mixtes. Malheureusement, tel n'a pas été le cas, et nous avons dû chercher des peptides qui soient solubles dans un solvant organique.

Nous avons essayé la D-leucyl-glycyl-glycine qui possède une molécule moins régulière que celles des polyglycines et doit donc être plus soluble que celles-ci.

Il a été possible de faire une solution sursaturée 0,0017-m. de ce corps dans la diméthylformamide, et d'y ajouter du chloroformiate d'éthyle à froid, de façon à obtenir l'anhydride mixte. Après adjonction de tributylamine, la réaction a été suivie par l'intensité de

la teinte que donnait une prise du mélange réactionnel avec la ninhydrine, ce qui permettait de suivre la disparition du groupe amino libre. Après 30 min. cette coloration avait très fortement diminué, indiquant ainsi la fin de la réaction.

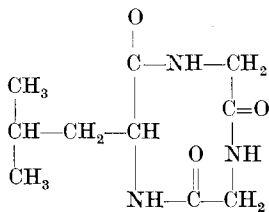
Avec une concentration aussi faible que 0,0017-m., la probabilité de formation du cycle est beaucoup plus grande pour un tripeptide que celle de la formation d'une chaîne (voir Tableau I), ceci pour autant que les molécules ne sont pas associées par leurs groupes polaires (carboxyliques, amino ou peptidiques).

Après évaporation du solvant, le produit de réaction, dissous dans de l'eau alcaline, a été extrait à l'alcool butylique secondaire, afin de retirer les corps ne possédant pas de groupes carboxyliques libres.

Nous avons ainsi obtenu, avec un rendement de 37 %, un produit neutre, qui par hydrolyse donne de la leucine, et, en quantités plus fortes, de la glycine. Ce corps ne réagit pas à la ninhydrine, et ne possède donc pas de groupes α -aminés libres. Le test pour la présence de groupes carboxyliques libres selon *Waley & Watson*¹⁾ a été négatif (un test comparatif fait sur la carbéthoxy-leucyl-glycyl-glycine a été positif). Ce corps ne possède donc pas non plus de groupe carboxylique libre.

Sa grande solubilité dans les solvants alcooliques exclut la possibilité d'une très longue chaîne formée de périodes de restes leucyl-glycyl-glycyl.

Il s'agit donc bien d'un tripeptide cyclique, le cyclo-leucyl-glycyl-glycyle.



La présence de cyclohexapeptide n'est pas exclue, mais ce corps doit être en proportion sensiblement plus faible que le cyclo-tripeptide, car sa probabilité de formation est beaucoup plus petite.

Dans la couche aqueuse, après l'extraction à l'alcool butylique secondaire, on trouve encore, à côté de leucyl-glycyl-glycine, des produits de polycondensation linéaire de celle-ci résultant de la compétition entre la condensation peptidique intramoléculaire donnant un cycle, et la condensation peptidique intermoléculaire conduisant à des chaînes. Un chromatogramme a révélé, à côté du spot de la leucyl-glycyl-glycine, des spots d'autres peptides.

¹⁾ *S. G. Waley & J. Watson, Soc. 2394; cf. J. Tibbs, Nature 168, 910 (1951).*

En effectuant la réaction de cyclisation de la leucyl-glycyl-glycine dans une solution 0,0017-m., la probabilité de formation de cycle aurait — d'après nos calculs — dû être près de 200 fois plus grande que la probabilité de formation de chaînes au début de la réaction, et ce rapport des probabilités aurait dû croître encore au cours de la réaction. Si à côté du produit cyclique, nous avons obtenu également une quantité appréciable de produits en chaîne, ce fait indique donc que, même en solution très diluée, il y a association entre différentes molécules de tripeptide. L'emploi d'un solvant polaire comme la diméthylformamide tend pourtant à réduire cette association au minimum.

Il est clair que c'est ce même phénomène d'association qui rend impossible la dissolution d'acides aminés, ou de peptides à chaînes régulière (polyglycines) dans la diméthylformamide. On peut donc considérer que lorsqu'un polypeptide se dissoudra facilement dans un solvant organique, l'association entre les molécules sera diminuée, et ainsi la probabilité de cyclisation augmentera.

L'eau est un excellent solvant, mais malheureusement, nous n'avons pas réussi à former un anhydride mixte en solution aqueuse, quoique ces anhydrides mixtes présentent une stabilité suffisante dans l'eau.

Nous remercions vivement le *Fonds pour l'encouragement des recherches scientifiques* (Berne) ainsi que la *Rockefeller Foundation* (New York) pour l'aide qu'ils nous ont accordée.

Partie expérimentale.

Le nombre de millimoles est indiqué entre parenthèses.

Phtalylglycyl-glycinate d'éthyle à partir d'un mélange de phtalylglycine et de glycinate d'éthyle. A 862 mg (4,2) de phtalylglycine et 586 mg (4,2) de chlorhydrate de glycinate d'éthyle dans 10 cm³ de dioxanne, on ajoute 1 cm³ (4,2) de tri-n-butylamine. La solution est refroidie à 10° et additionnée de 0,4 cm³ (4,2) de chloroformiate d'éthyle. Après 30 min., on ajoute encore 1 cm³ (4,2) de tri-n-butylamine et élève régulièrement la température jusqu'à 40° en 30 min. Le précipité se dissout peu à peu. Après 2 h. il s'est formé un nouveau précipité. On ajoute à 0° 50 cm³ d'eau et filtre le précipité qui est lavé par HCl n., HNaCO₃ 0,5-m. et H₂O. Après séchage, on obtient 711,5 mg de phtalyl-glycyl-glycinate d'éthyle F. 195° (litt.¹⁾ 194—195°; rendement 58,4%.

Si l'on ajoute d'abord la tri-n-butylamine et ensuite le chloroformiate d'éthyle, le rendement tombe à 27,4%.

Cyclo-D-leucyl-glycyl-glycyle. On dissout en chauffant 306 mg (1,25) de D-leucyl-glycyl-glycine dans 75 cm³ de N-diméthylformamide sous forte agitation et à l'abri de l'humidité. On refroidit la solution à 0° et ajoute immédiatement 0,13 cm³ (0,13) de chloroformiate d'éthyle. On continue à agiter et ajoute après 10 min. 0,35 cm³ (0,14) de tri-n-butylamine. La température est maintenue 15 min. entre 2 et 3°, puis le mélange est abandonné 30 min. à la température ordinaire. Un spot sur papier de la solution ne donne plus qu'une très faible réaction à la ninhydrine après chauffage à 100° (ninhydrine 0,4% dans mélange alcool butylique secondaire-eau-acide acétique glacial 89—10—1).

¹⁾ R. A. Boissonas, Helv. 34, 878 (1951).

La diméthylformamide est distillée dans le vide. Elle passe à 38°, la température du bain étant 45°. Le résidu est repris par HCl n. et du chloroforme. La solution chloroformique est lavée à la soude caustique 0,1-n. et à l'eau, séchée sur du sulfate de sodium et évaporée dans le vide. On obtient 10,25 mg d'un produit qui ne réagit pas à la ninhydrine et donne par hydrolyse acide de la glycine et de la leucine.

La solution chlorhydrique est alcalinisée avec de la soude caustique. Par extraction au chloroforme on enlève la tri-n-butylamine. On extrait ensuite la solution alcaline par de l'alcool butylique secondaire et l'on obtient 84 mg d'un produit qui ne réagit pas à la ninhydrine et ne contient pas de groupes carboxyliques libres (test de *Waley & Watson*¹⁾). Par hydrolyse et chromatographie sur papier, on obtient les spots de la leucine et de la glycine dans la proportion de 1 à 2. Il n'a pas été possible de cristalliser le produit cyclique.

La solution alcaline aqueuse donne après l'extraction à l'alcool butylique secondaire une réaction positive à la ninhydrine. Un chromatogramme sur papier (n-butanol — acide acétique glacial — eau 7—1—2) de cette solution donne 4 spots parmi lesquels se trouve celui de la D-leucyl-glycyl-glycine qui n'a pas réagi.

SUMMARY.

A method for the cyclisation of linear neutral peptides has been elaborated. D-leucyl-glycyl-glycine has been cyclised into cyclo-D-leucyl-glycyl-glycyl with a 37% yield.

Laboratoires de Chimie organique
de l'Université de Genève.

278. Scission, par la phénylhydrazine, du groupe « phtalyle » d'acides aminés et de peptides N-phtalylés

par Ingeborg Schumann et R. A. Boissonnas.

(25 IX 52)

Parmi les divers groupes employés pour protéger la fonction amino d'acides aminés ou de peptides pendant les synthèses peptidiques, le groupe phtalyle a l'avantage de donner des dérivés stables et facilement cristallisables²⁾).

La scission de ces groupes phtalyle est généralement effectuée en chauffant le dérivé N-phtalylé avec l'hydroxyde d'hydrazine en solution alcoolique et en décomposant le composé intermédiaire qui se forme, par chauffage dans un acide dilué³⁾.

Nous avons trouvé que cette scission est plus aisément effectuée en chauffant le dérivé N-phtalylé avec la phénylhydrazine au lieu

¹⁾ *S. G. Waley & J. Watson, Soc. 2394 (1951).*

²⁾ *J. H. Billmann & W. F. Harting, Am. Soc. 70, 1473 (1948).*

³⁾ *H. R. Ing & R. H. F. Manske, Soc. 2348 (1926); D. A. Kidd & F. E. King, Nature 162, 776 (1948); Soc. 3315 (1949); J. C. Sheehan & V. S. Frank, Am. Soc. 71, 1856 (1949); V. Grassmann & E. Schulte-Uebbing, B. 83, 244 (1950); J. C. Sheehan, Chapman & Roth, Am. Soc. 74, 3822 (1952).*